

539,281

Rec'd PCT/PTO

16 JUN 2005

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年7月1日 (01.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/055179 A1(51) 国際特許分類⁷: C12N 9/80, 1/20, C12P 41/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/016182

(22) 国際出願日: 2003年12月17日 (17.12.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-366389

2002年12月18日 (18.12.2002) JP

特願 2003-351560

2003年10月10日 (10.10.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 第一化学薬品株式会社 (DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-0027 東京都中央区日本橋 3丁目 13番5号 Tokyo (JP).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 磯部 公安 (ISOBE, Kimiyasu) [JP/JP]; 〒020-0111 岩手県盛岡市黒石野 3丁目 15-40 Iwate (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山口 成樹 (YAMAGUCHI, Seiki) [JP/JP]; 〒028-7305 岩手県岩手郡松尾村松尾 4-115 第一化学薬品株式会社 岩手工場生産技術センター内 Iwate (JP). 小林 正幸 (KOBAYASHI, Masayuki) [JP/JP]; 〒028-7305 岩手県岩手郡松尾村松尾 4-115 第一化学薬品株式会社 岩手工場生産技術センター内 Iwate (JP). 熊谷 伸弥 (KUMAGAI, Shinya) [JP/JP]; 〒028-7305 岩手県岩手郡松尾村松尾 4-115 第一化学薬品株式会社

岩手工場生産技術センター内 Iwate (JP). 晒名 貴美 (SARASHINA, Takami) [JP/JP]; 〒319-1112 茨城県那珂郡東海村松 2117 第一化学薬品株式会社 ゲノムサイエンス研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町 1丁目3番6号共同ビル Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 明細書とは別に規則 13 の 2 に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: D-AMINOACYLASE

(54) 発明の名称: D-アミノアシラーゼ

(57) Abstract: It is intended to provide a D-aminoacylase which has a high substrate specificity and thus makes it possible to conveniently, efficiently and less economically produce a D-amino acid from an N-acetyl-D,L-amino acid. A D-aminoacylase produced by a microorganism belonging to the genus *Deffluvibacter* which has the following characteristics: acting on an N-acetyl-D-amino acid; having a molecular weight (electrophoresis) of about 55,000 Da; having an isoelectric point (modified two-dimensional electrophoresis) of 5.3; acting on N-acetyl-D-valine, N-acetyl-D-leucine, etc. but not on N-acetyl-L-valine, N-acetyl-L-leucine, etc.; having an optimum temperature of 37°C (pH 8) and an optimum pH value of from 8 to 8.5 (37°C); being inhibited in activity by 1 mmol/L of Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺; and being inhibited in activity by 5 mmol/L of dithiothreitol, 2-mercaptoethanol, o-phenanthroline and L-cysteine.(57) 要約: 基質特異性が高く、N-アセチル-D、L-アミノ酸よりD-アミノ酸を簡便かつ効率的さらに安価に製造することができるD-アミノアシラーゼの提供。デフルビバクター (*Deffluvibacter*) 属に属する微生物が産生するN-アセチル-D-アミノ酸に作用し、分子量 (電気泳動) 約55,000ダルトン、等電点 (変性系2次元電気泳動) 5.3、N-アセチル-D-バリン、N-アセチル-D-ロイシン等に作用し、N-アセチル-L-バリン、N-アセチル-L-ロイシン等に作用しない、至適温度37°C (pH 8)、至適pH 8~8.5 (37°C)、1 mmol/LのMn²⁺、Co²⁺、Ni²⁺、Zn²⁺で活性が阻害され、5 mmol/Lのジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール、o-フェナントリン、L-システインで活性が阻害されるD-アミノアシラーゼ。

WO 2004/055179 A1

明 細 書

D-アミノアシラーゼ

技術分野

本発明は、デフルビバクター (Defluviibacter) 属細菌より産生される新規な D-アミノアシラーゼ及び該 D-アミノアシラーゼを用いた医薬品、化成品等にご利用される D-アミノ酸の製造法に関する。

背景技術

近年、D-アミノ酸が医薬品等の原料として有効であることが明らかになり、光学的に純度の高い D-アミノ酸を安価に製造することが産業上重要な課題となっている。この方法として一般的に、化学合成したラセミ体を分割する方法が用いられ、特に副生成物や多量の廃溶媒を発生させない酵素法が現在注目されている。

従来、D-アミノ酸の酵素法による製造方法として、N-アセチル-L-アミノ酸に D-アミノアシラーゼを作用させ、D-アミノ酸を特異的に得る方法が知られていて工業化されている。

D-アミノアシラーゼを産生する微生物として、シュードモナス・エスピー (Pseudomonas sp.) AAA 6 0 2 9 株 (例えば、Chemical and Pharmaceutical Bulletin (米国)、1978年、第26巻、p2698)、ストレプトミセス・オリバゼウス (Streptomyces olivaceus) S・6 2 株 (例えば、特開昭 5 3 - 5 9 0 9 2 号公報)、アルカリゲネス・キシロースオキシダンス・サブスピーシーズ・キシロースオキシダンス (Alcaligenes xylosoxydans subsp. xylosoxydans) A-6 株 (例えば、特開平 2 - 2 3 4 6 7 7 号公報) 等が挙げられ、これらの微生物由来の D-アミノアシラーゼが報告されている。

しかしながら、これらのD-アミノアシラーゼはN-アセチル-D, L-アミノ酸の種類により反応特性が大きく異なり、公知のD-アミノアシラーゼを用いて広範囲のD-アミノ酸を安価に製造することは困難であった。

また、D-アミノ酸を工業的に製造するために、遺伝子組み換え技術を用いて生産されたD-アミノアシラーゼを使用する方法（例えば、特開2001-185号公報及び特開2001-275688号公報）が知られているが、本質的に反応性の低いN-アセチル-D-アミノ酸に酵素を作用させてD-アミノ酸を製造するには多量の酵素が必要であるため、価格や生産量に制限がある。

発明の開示

本発明は、従来報告されている酵素では反応性が低いN-アセチル-D-アミノ酸に対して高い活性を有するD-アミノアシラーゼを産生する新規微生物を自然界より見出し、D-アミノ酸を安価に製造する為の新規なD-アミノアシラーゼの製造法及び該新規なD-アミノアシラーゼを用いたD-アミノ酸の製造方法を提供する。また、該新規なD-アミノアシラーゼを産生する微生物を提供することにある。

本発明者等は、上述の問題点を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、従来の酵素では反応性が低い基質に対しても良く作用する新規なD-アミノアシラーゼを産生する能力を有するデフルビバクター（*Defluviobacter*）属細菌を自然界より見出し、この知見に基づいて本発明を完成した。

すなわち、本発明は、次の酵素学的性質を有するD-アミノアシラーゼを提供するものである。

- (a) 作用：N-アセチル-D-アミノ酸に作用しD-アミノ酸を生成する。
- (b) 分子量：SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における測定で、分子量約55,000ダルトンを示す。
- (c) 等電点：変性系2次元電気泳動における測定で、等電点5.3を示す。

(d) 基質特異性：N-アセチル-D-アミノ酸に作用し、特にN-アセチル-D-バリンに良く作用し、N-アセチル-L-アミノ酸に作用しない。基質として、N-アセチル-D-バリン、N-アセチル-D-ロイシン、N-アセチル-D-メチオニン、N-アセチル-D-トリプトファン、N-アセチル-D-フェニルアラニン、N-アセチル-D-チロシンに作用し、N-アセチル-L-バリン、N-アセチル-L-ロイシン、N-アセチル-L-メチオニン、N-アセチル-L-トリプトファン、N-アセチル-L-フェニルアラニン、N-アセチル-L-チロシンには作用しない。

(e) 温度安定性：pH 8.5で1日加温した場合、4℃から30℃まで比較的安定である。

(f) 至適温度：pH 8で30分反応させた場合、37℃において作用が至適である。

(g) pH安定性：温度30℃で1日加温した場合、pH 9付近で安定であり、pH 7付近からpH 10付近でも比較的安定である。

(h) 至適pH：温度37℃で反応させた場合、pH 8からpH 8.5付近で最も良く作用する。

(i) 金属イオンの影響：1 mmol/Lの Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} で活性が阻害される。

(j) 阻害剤の影響：5 mmol/Lのジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール、o-フェナントリン、L-システインで活性が阻害される。

また、本発明は、次の(a)又は(b)のいずれかに記載のタンパク質からなるD-アミノアシラーゼ及び当該D-アミノアシラーゼをコードする遺伝子を提供することである。

(a) 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入したアミノ酸配列からなり、D-アミノアシラーゼ活性を有す

るタンパク質。

また本発明は、N-アセチル-D, L-アミノ酸又はN-アセチル-D-アミノ酸をD-アミノ酸に効率的に変換するD-アミノアシラーゼを産生するデフルビバクター (Defluviibacter) 属に属する微生物を提供するものである。

また、本発明は、該微生物を培養し、その培養物から、前記のD-アミノアシラーゼを採取することを特徴とするD-アミノアシラーゼの製造方法を提供するものである。

また、本発明は、当該D-アミノアシラーゼをN-アセチル-D, L-アミノ酸又はN-アセチル-D-アミノ酸に作用させることを特徴とするD-アミノ酸の製造方法を提供するものである。

本発明により、デフルビバクター (Defluviibacter) 属に属する微生物より得られた新規なD-アミノアシラーゼは、基質特異性が高く例えば、N-アセチル-D, L-バリン、N-アセチル-D, L-メチオニン、N-アセチル-D, L-トリプトファン、N-アセチル-D, L-ロイシン、N-アセチル-D, L-フェニルアラニン、N-アセチル-D, L-チロシン等よりD-アミノ酸を簡便かつ効率的さらに安価に製造することができる。

図面の簡単な説明

図1は、本酵素の電気泳動法による分子量測定時の電気泳動像を示す図である。

図2は、本酵素の温度安定性測定時の残存活性を示す図である。

図3は、本酵素の至適温度測定時の相対活性を示す図である。

図4は、本酵素のpH安定性測定時の残存活性を示す図である。

図5は、本酵素の至適pH測定時の相対活性を示す図である。

図6は、N-アセチル-D, L-バリンの分割率を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、新規なD-アミノアシラーゼを産生する能力を有する微生物を自然界から見出し、新規なD-アミノアシラーゼの諸性質並びにその遺伝子を明らかにし、D-アミノ酸の製造に有効であることを明らかにする事により確立された。

すなわち、本発明の新規なD-アミノアシラーゼを産生する微生物としては、上記の本発明D-アミノアシラーゼを産生するものである限り特に限定されないが、本発明で見出した新規なD-アミノアシラーゼ産生菌の一例は、第一化学薬品株式会社・岩手工場内の土壤中より単離されたデフルビバクター (Defluviobacter) 属に属する微生物であり、例えば、デフルビバクター エスピー A 1 3 1-3 (Defluviobacter sp. A131-3) 等が挙げられる。当該A 1 3 1-3 株は次のような菌学的性質を有する。

(形態的所見)

1. 細胞形態：桿菌 (0.6~0.7×1.5~2.0 μm)
2. グラム染色：陰性
3. 孢子形成：なし
4. 運動性：あり
5. 鞭毛：あり
6. 普通寒天培地：円形、全縁滑らか、低凸状、光沢あり、くすんだ灰色から黄褐色

(生理学的性質)

1. カタラーゼ生産：陽性
2. オキシダーゼ生産：陽性
3. 酸/ガス生産 (グルコース)：陰性
4. O/Fテスト (グルコース)：陰性
5. 嫌気性生育：しない

6. 好気性成育：絶対好気性

(生物学的性状)

API 20 NE 同定システム (bioMerieux France) を使い、その測定方法に従い生化学的性状試験を実施した。

1. 硝酸塩還元：陰性
2. インドール生産：陰性
3. ブドウ糖 酸性化：陰性
4. アルギニンジヒドラーゼ：陰性
5. ウレアーゼ：陰性
6. エスクリン加水分解：陰性
7. ゼラチン加水分解：陰性
8. β -ガラクトシダーゼ：陰性
9. チトクロームオキシダーゼ：陽性

(資化性試験)

1. ブドウ糖：陽性
2. L-アラビノース：陰性
3. D-マンノース：陽性
4. D-マンニトール：陰性
5. N-アセチル-D-グルコサミン：陽性
6. マルトース：陰性
7. グルコン酸カリウム：陽性
8. n-カプリン酸：陰性
9. アジピン酸：陰性
10. DL-リンゴ酸：陽性
11. クエン酸ナトリウム：陰性
12. 酢酸フェニル：陰性

1 3. 2, 4-ジクロロフェノール：陰性

1 4. フェノール：陰性

(脂肪酸組成分析)

脂肪酸組成測定には、ガスクロマトグラフィーシステムHP 6 8 9 0 (Hewlett-Packard, CA, USA) を用い、菌種データ照合はSherlock Microbial Identification System (MIDI, DE, USA) を用い、データベースはMIS Standard Libraries (MIDI, DE, USA) のT S B A (Version 4. 0)を用いた。

1. 要脂肪酸： $C_{18:1\omega 7c}$ の直鎖・モノ不飽和脂肪酸

2. ヒドロキシ脂肪酸： $C_{12:0} 3 OH$

(ユビキノン分析)

高速液体クロマトグラフを用いユビキノン標準試料のリテンションタイムの比較から分子種の同定を行った。

1. 主要ユビキノン系：Q-10

(細胞壁アミノ酸分析)

高性能薄層プレートHPTLC (Merck, NJ, USA)を用いて、細胞壁ペプチドグルカンに含まれる特異的アミノ酸を対照として展開し、特異的アミノ酸の検出を行った。

細胞壁アミノ酸：meso-ジアミノピメリン酸

(16S rDNA-Full塩基配列解析)

BLASTを用いてDNA塩基配列データベース (GenBank) に対して相同性検索を行った。

1. デフルビバクター ルサチエンシス (*Defluviobacter lusatiensis* DSM11099) と99.9%の16S rDNA相同性

以上の生化学的および菌学的諸性質から、自然界より新たに発見した微生物はデフルビバクター (*Defluviobacter*) 属の細菌に分類されたが、同様の性質を持つ微生物としてはデフルビバクター (*Defluviobacter*) 属の*Defluviobacter*

lusatiensis DSM11099が報告されている(Defluviibacter lusatiae gen. nov. , sp. nov. , a new chlorophenol-degrading member of the α -2 subgroup of proteobacteria. Syst. Appl. Microbiol. ,1999,22,197-204.)。しかし、公知のデフルビバクター(Defluviibacter)属の細菌がD-アミノアシラーゼを産生することの記載はなく、デフルビバクター(Defluviibacter)属の微生物がD-アミノアシラーゼを産生する能力を持つことは、本発明で初めて明らかにされた。なお、本発明で発見した菌株はデフルビバクター・エスピー A131-3 (Defluviibacter sp. A131-3)と命名し、平成14年9月26日、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6(郵便番号305-8566))にFERM BP-08563として寄託した。

そして、本発明で見出した新規なD-アミノアシラーゼを得るためには、デフルビバクター属の細菌、例えばデフルビバクター・エスピー A131-3 (Defluviibacter sp. A131-3)株を親株として人工的に変異処理及び突然変異、又は組み換えDNA操作などの公知の一般的な酵素の生産性及び性質を向上させる方法で得られた遺伝子組み換え体や、その変異株や改良株を用いることも可能である。

本発明の新規なD-アミノアシラーゼは、当該微生物を適当な培地に接種し培養することにより得ることができる。

ここで使用される培地は、通常の微生物の培地に用いられ、当該微生物が生育し新規なD-アミノアシラーゼが産生されるものであれば、特に限定されないが、該培地中には、資化し得る窒素源、炭素源、無機塩類を適当量含有せしめておくことが好ましい。

窒素源、炭素源、無機塩類は特に制限されない。

例えば窒素源として、肉エキス、酵母エキス、ペプトン等が挙げられる。炭素源として、グルコース、フルクトース、ショ糖、グリセリン、酢酸等が挙げられ

る。無機塩類として、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム、硝酸アンモニウム、硫酸鉄、硫酸亜鉛等が挙げられる。

また、本発明のD-アミノアシラーゼの生成に誘導物質等は特に必要ないが、D-アミノアシラーゼ高産生化のために、誘導化物質として、N-アセチル-D-アミノ酸或いはN-アセチル-D, L-アミノ酸等のアシル化アミノ酸誘導体を培地中に0.01~0.5重量%（以下単に%と記載する）程度添加することが望ましく、特に、N-アセチル-D-バリン、N-アセチル-D-ロイシン等が誘導物質として有効である。

培地のpHは、菌が生育可能な範囲であればいずれのpH範囲でも良いが、特に7~9程度が好ましく、培養温度は15~40℃、より好ましくは25~37℃である。培養時間は、20~48時間液体培地を用い振とう培養することが好ましいが、用いる培地によって時間は変動する。また、同様の培地に寒天を加えた固体培地でも菌の培養を行うことが可能である。

このような方法によって得られた微生物菌体中に、D-アミノアシラーゼが産生される。

培養物からの目的物質であるD-アミノアシラーゼの採取及び精製は、一般の酵素の採取及び精製手段に準じて行うことができる。すなわち、培養物を遠心又はろ過などによって菌体を分離し、機械的磨砕又は超音波破碎等により菌体を破碎し、その破碎液から通常分離手段、例えば、疎水クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等により採取、精製する方法が挙げられる。

このようにして得られた、本発明D-アミノアシラーゼの酵素学的性質及びアミノ酸配列は次のとおりである。また、本発明D-アミノアシラーゼ遺伝子の塩基配列も以下に示す。

- (1) 作用：N-アセチル-D-アミノ酸に作用しD-アミノ酸を生成する。
- (2) 分子量：定法に則り、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（第一化

学薬品（株）製、PAGミニ「第一」10/20）を行い、タンパク質分子量マーカー（第一化学薬品（株）製、タンパク質分子量マーカー「第一」・III）の移動度より分子量を求めた結果、約55,000ダルトンを示す。

（3）等電点：2次元電気泳動法に則り、変性系2次元電気泳動（第一化学薬品製、IPGチューブゲル「第一」4-10及び、PAGラージ「第一」2D-10/20）を行い、2D-タンパク質等電点マーカー（第一化学薬品（株）製、2D-タンパク質等電点マーカー「第一」）の移動度より等電点を求めた結果、pI値5.3を示す。

（4）基質特異性：以下のN-アセチル-D-アミノ酸及びN-アセチル-L-アミノ酸を基質として、D-アミノ酸オキシダーゼ或いはL-アミノ酸オキシダーゼを組み合わせる方法で本発明のアシラーゼの基質特異性を確認した。以下のN-アセチル-D-アミノ酸に作用し、N-アセチル-L-アミノ酸には作用しない。N-アセチル-D-アミノ酸としてN-アセチル-D-バリンに最も良く作用し、N-アセチル-D-ロイシン、N-アセチル-D-メチオニン、N-アセチル-D-トリプトファン、N-アセチル-D-フェニルアラニン、N-アセチル-D-チロシンにも作用する。N-アセチル-L-バリン、N-アセチル-L-ロイシン、N-アセチル-L-メチオニン、N-アセチル-L-トリプトファン、N-アセチル-L-フェニルアラニン、N-アセチル-L-チロシンには作用しない。

尚、L-アミノ酸の測定は、下記に示す活性測定法で、D-アミノ酸オキシダーゼの代わりにL-アミノ酸のオキシダーゼを使用する。

（5）温度安定性：pH8.5で4℃、25℃、30℃、40℃、50℃で1日加温し、下記の活性測定法に則り残存する酵素活性を測定した結果、4℃から30℃まで比較的安定である。

（6）至適温度：pH8で4℃、25℃、30℃、37℃、40℃で下記の活性測定法に則り酵素活性を測定した結果、37℃において作用が至適である。

(7) pH安定性：温度 30℃でpH4から12で1日間加温後、下記の活性測定法に則り残存する酵素活性を測定した結果、pH9付近で安定であり、pH7付近からpH10付近までは比較的安定である。

(8) 至適pH：温度 37℃でpH6から12で下記の活性測定法に則り酵素活性を測定した結果、pH8からpH8.5付近で最も良く作用する。

(9) 金属イオンの影響：酵素液に金属イオンとして、塩化カルシウム・2水和物、塩化鉄(III)・6水和物、塩化ナトリウム、塩化コバルト(II)・6水和物、塩化カリウム、塩化ニッケル・6水和物、塩化マグネシウム・6水和物、硫酸銅(II)・5水和物、塩化マンガン(II)・4水和物、塩化亜鉛、モリブデン酸ナトリウムを、1mmol/Lになるように添加して、N-アセチル-D, L-バリンと反応させ、生成されたD-バリン量をHPLCで測定した結果、1mmol/Lの Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} で活性が阻害される。

(10) 阻害剤の影響：酵素液に阻害剤として、エチレンジアミン四酢酸、2-メルカプトエタノール、N-エチルマレイミド、o-フェナントリン、L-システイン、ヨードアセトアミド、ジチオスレイトールを、5mmol/Lになるように添加して、N-アセチル-D, L-バリンと反応させ、生成したD-バリン量をHPLCで測定した結果、5mmol/Lのジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール、o-フェナントリン、L-システインで活性が阻害される。

本発明D-アミノアシラーゼ遺伝子の塩基配列及びD-アミノアシラーゼタンパク質アミノ酸配列は、以下の公知の方法により決定した。

精製された酵素のN末及び内部アミノ酸配列から考えられるDNAをすべて包含したミックスプライマーより、デフルビバクター・エスピー A131-3 (Defluviobacter sp. A131-3) より抽出精製したDNAを用い、PCR法の反応結果から、得られた増幅産物をクローニングした結果、本発明D-アミノアシラーゼ遺伝子の塩基配列は配列番号1に記載の塩基配列と決定した。また、その塩基配列から、本発明D-アミノアシラーゼタンパク質は配列番号2に記載のアミ

ノ酸配列を有することが判明した。

本発明のD-アミノアシラーゼには、(a) 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質だけでなく、(b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入したアミノ酸配列からなり、D-アミノアシラーゼ活性を有するタンパク質が含まれる。ここで、上記の1もしくは数個のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入されたアミノ酸配列には、配列番号2のアミノ酸配列と80%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列が含まれる。

本発明のD-アミノアシラーゼ遺伝子としては、前記(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子であれば制限されないが、(c) 配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAだけでなく、(d) 配列番号1に記載の塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつD-アミノアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAが好ましい。ここで、ストリンジェントな条件としては、例えば0.1% SDSを含む0.2×SSC中50℃の条件、0.1% SDSを含む1×SSC中60℃の条件を挙げることができる。また、上記のストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAには、配列番号1に記載の塩基配列と80%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAが含まれる。

アミノ酸オキシダーゼを用いたアシラーゼ活性の測定方法：10mLの0.1 mol/Lリン酸緩衝液pH8に4-Aminoantipyrine 0.61mg（ナカライテスク（株）製、Code:01907-52）、N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline, sodium, salt, dihydrate 3.22mg（Dojindo Laboratories製、Code:OC13）、PEROXIDASE 30 unit（SIGMA社製、Code:P-6782）、D-AMINO ACID OXIDASE 1 unit（SIGMA社製、Code:A-9128）又はL-AMINO ACID OXIDASE 1 unit（SIGMA社製、Code:A-5147）、を溶解して発色試薬とした。この発色試薬500μLと100mmol/LのN-アセチル-L-バリン100μL、測

定酵素サンプル100 μ L、0.1mol/Lリン酸緩衝液(pH8)300 μ Lを含む1mLの反応液を37℃で30分間加温後、分光光度計を用い555nmの吸光度値を測定し、D-バリンを用いて作成した検量線から酵素活性を求めた。

尚、1Uは1分間に1 μ molのD-バリンの生成を触媒する酵素量とした。

HPLCを用いたアシラーゼの測定方法：Inertsil ODS-2 (GLサイエンス(株)製)カラムを用い、0.015%1-ペンタンスルホン酸ナトリウム(pH2.5)：アセトニトリル=80：20緩衝液を用い、流速0.5mL/分、検出230nm、カラム温度30℃で分析した。酵素活性は検出されたアセチル体と遊離体の面積比から、無添加を100として分割率を求め、相対活性値で表す。

得られた新規なD-アミノアシラーゼは、N-アセチル-D-アミノ酸に特異的に作用し、N-アセチル-L-アミノ酸には作用しないので、N-アセチル-D-アミノ酸からD-アミノ酸を製造するために利用できるが、N-アセチル-D, L-アミノ酸からD-アミノ酸を分割分離するためにも使用される。すなわち、D, L-アミノ酸をアセチル化してN-アセチル-D, L-アミノ酸とし、次にD-アミノアシラーゼを加えてN-アセチル-D-アミノ酸を加水分解しD-アミノ酸を生成する事により、D-アミノ酸とL-アミノ酸を分離することが可能である。なお、N-アセチル-D-アミノ酸のみを用いれば、D-アミノ酸だけが得られる。

D-アミノアシラーゼをN-アセチル-D, L-アミノ酸又はN-アセチル-D-アミノ酸に作用させる場合、D-アミノアシラーゼ添加量は、通常1～1000U/mL基質溶液の範囲で、好ましくは50～500U/mL基質溶液である。また、N-アセチル-D, L-アミノ酸又はN-アセチル-D-アミノ酸量は1～40重量%（以下%と記載する）、さらには5～25%水溶液とすることが好ましい。

反応温度は10～50℃、さらには15～45℃であるのが好ましく、反応は

pH 6.5～10.5、さらには7.5～10であるのが好ましい。また、反応時間は0.2～10日間、さらには1～5日間であるのが好ましい。

反応液からのD-アミノ酸の分離回収は、例えば、濃縮、等電点、沈殿、イオン交換樹脂処理、膜分離等の公知の方法で行なわれる。

実施例

以下に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に制限されるものではない。

実施例1 デフルビバクター エスピー A131-3株の単離

第一化学薬品株式会社岩手工場内の土壌を採取し、次法により菌体を採取した。

培地として、硝酸アンモニウム0.2%、リン酸二水素カリウム0.2%、リン酸水素二ナトリウム0.1%、硫酸マグネシウム・7水塩0.05%、誘導物質N-アセチル-D, L-バリン0.2%を含むpH 8.5の培地に少量の土壌を添加し30℃で試験管を用いて振盪培養した。次に同様の培地で寒天2%を含む同一培地組成の平板培地上に培養液をプレートアウト（接種）し、30℃で培養後生育した微生物を分離した。

分離した微生物を再度上記と同一組成の培地を用いて試験管で振盪培養し、以下の2つの方法で従来とは異なるD-アミノアシラーゼを産生する能力を有する微生物を選抜した。

(1) D-アミノアシラーゼ活性測定法：5 mLの0.1 mol/Lリン酸緩衝液pH 8に4-Aminoantipyrine 0.61 mg（ナカライテスク（株）製、Code:01907-52）、N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline, sodium, salt, dihydrate 3.22 mg（Dojindo Laboratories製、Code:0C13）、PEROXIDASE 30 unit（SIGMA社製、Code:P-6782）、D-AMINO ACID OXIDASE 1 unit（SIGMA社製、Code:A-9128）、を溶解して発色試薬とした。この発色試薬100 μL

と、100 mmol/LのN-アセチル-D, L-バリン100 μ Lと上記培養液を遠心分離し再懸濁を行った菌体液100 μ Lをマイクロプレートのセル中で混和し37℃で1時間反応後、マイクロプレートリーダーを用いて555 nmの吸光度を測定した。発色が確認された菌株についてD-アミノアシラーゼ活性を持つ菌株として選んだ。

(2) HPLC分析による産生菌の選抜：次に上記の発色法でN-アセチル-D, L-バリンに対して強い活性を示すことが確認された菌株について、下記のHPLCによる分析を行った。

カラム：SUMICHIRAI OA-5000 (5 μ m, 4.6 mm ϕ \times 150 mm)、移動相：2 mmol/L硫酸銅：アセトニトリル＝90：10、温度：40℃、流速：0.8 mL/min、検出：230 nmの条件で、培養後遠心分離した菌体と100 mmol/LのN-アセチル-D, L-バリンの反応液30 μ Lを用いて、N-アセチル-D, L-アミノ酸の分解とD-アミノ酸あるいはL-アミノ酸の生成を、N-アセチル-D-バリン、N-アセチル-L-バリンとD-バリン、L-バリンが溶出される時間のピーク面積より分析した。その結果、発色法で選抜した菌株はいずれもN-アセチル-D-バリンが速やかに減少し、N-アセチル-D-バリンの減少量に相当するD-バリンの増加が認められた。

次に、各種のN-アセチル-D, L-アミノ酸との反応を比較して、D-アミノ酸に特異性が高く、さらに既存のD-アミノアシラーゼとは異なりD-バリンに対する反応性が優れている酵素を産生する微生物を新規なD-アミノアシラーゼ産生菌として選抜した。

このような方法を経て得られた菌株は、前記の菌学的性質を有するものであった。この菌株をデフルビバクター エスピー A131-3株と命名した。

実施例2 D-アミノアシラーゼの製造

デフルビバクター エスピー A131-3株を、実施例1で使用した培地に粉末酵母エキスD-3 0.1% (和光純薬工業(株)製、Code:390-

00531)、ポリペプロン0.1% (和光純薬工業(株)製、Code:394-00115)、塩化ナトリウム0.05%を添加したpH8の培地20Lで、ジャーファーマンターを用い30℃、150 r/min、27時間通気攪拌培養した。培養終了時の濁度(ABS660nm)は1.52で、pH7.75であった。

培養後、冷却遠心分離機(日立工機(株)製)を用い、4000 r/minで60分間遠心分離を行い集菌した。集菌した菌体を、20 mmol/L トリス-塩酸(pH8)緩衝液で洗浄した後、再度遠心分離機により菌体を集めて112 gの菌体を得た。得られた菌体は、-80℃で凍結保存した。

凍結保存菌体を融解し、菌体量の3倍の20 mmol/L トリス-塩酸(pH8)緩衝液340 mLで懸濁後、低温室内(4℃)で攪拌しながら投入式超音波破碎機を用い、120分間超音波破碎を行った。破碎後、高速冷却遠心機(日立工機(株)製)で8000 r/min、4℃、60分間遠心分離後、上清液365 mLを得た。これを粗酵素液とした。

なお、本菌株は培養時にN-アセチル-D, L-バリンを添加しなくともD-アミノアシラーゼを産生したが、N-アセチル-D, L-バリンを添加することにより、その酵素産生量を2倍以上に増加することが可能であった。

実施例3 D-アミノアシラーゼの精製

粗酵素液を透析チューブに詰め、0.1 mol/L 塩化ナトリウム含有20 mmol/L トリス-塩酸(pH8)緩衝液中に投入し、低温室内(4℃)で攪拌を行いながら、数回緩衝液を交換し一昼夜透析を行った。透析終了後、高速冷却遠心機(日立工機(株)製)で8000 r/min、4℃、60分間遠心分離後上清液342 mLを得た。

この、透析終了液の1/3量について以下の精製を行った。透析の終了した114 mLを、予め0.1 mol/L 塩化ナトリウム含有20 mmol/L トリス-塩酸(pH8)緩衝液で平衡化したTOYOPEARL Super Q-650Mカラム(東ソー(株)製)(4.4 cmφ×37.5 cm)に供して酵素を吸着させ

た。次に0.1 mol/L塩化ナトリウム含有20 mmol/Lトリスー塩酸 (pH8) 緩衝液1500 mLでカラムを洗浄し、続いて0.1 mol/L塩化ナトリウム含有20 mmol/Lトリスー塩酸 (pH8) 緩衝液5700 mLと0.3 mol/L塩化ナトリウム含有20 mmol/Lトリスー塩酸 (pH8) 緩衝液5700 mLを用いて直線濃度勾配法で酵素を溶出した。カラム流下後は25 mLずつ分取して、各フラクションのタンパク量(280 nmの吸光度)とD-アミノアシラーゼ活性(下記の酵素活性測定法を参照)を測定し、活性画分を回収した。

各フラクションのD-アミノアシラーゼ酵素活性は、10 mLの0.1 mol/Lリン酸緩衝液pH8に4-Aminoantipyrine 0.61 mg (ナカライテスク (株) 製、Code:01907-52)、N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline, sodium, salt, dihydrate 3.22 mg (Dojindo Laboratories製、Code:OC13)、PEROXIDASE 30 unit (SIGMA社製、Code:P-6782)、D-AMINO ACID OXIDASE 1 unit (SIGMA社製、Code:A-9128)、を溶解して発色試薬とした。この発色試薬500 μ Lと100 mmol/LのN-アセチル-D, L-バリン100 μ L、測定酵素サンプル100 μ L、0.1 mol/Lリン酸緩衝液(pH8) 300 μ Lを含む1 mLの反応液を37℃で30分間加温後、分光光度計を用い555 nmの吸光度値を測定した。

TOYOPEARL Super Q-650Mクロマトグラフィーで、D-アミノアシラーゼ活性が認められたフラクション画分(968 mL)をピバフロー50 (ザルトリウス (株) 製) 分画分子量10000の限外ろ過膜を用いて濃縮し、さらに、5 mmol/Lリン酸緩衝液(pH7.2)で透析した。

この透析した酵素液160 mLを予め5 mmol/Lリン酸緩衝液(pH7.2)で平衡化したBIO-GEL HT (BIO-RAD社製) ハイドロキシアパタイトカラム(2.2 cm ϕ × 20 cm)に吸着させた。

次に、5 mmol/Lリン酸緩衝液(pH7.2) 350 mLでカラムを洗浄し、続いて5 mmol/Lリン酸緩衝液(pH7.2) 750 mLと200 mmol/Lリン酸緩衝液(pH

7.2) 750 mLを用いて直線濃度勾配法で酵素を溶出した。カラム流下後は25 mLずつ分取して、各フラクションのタンパク量とD-アミノアシラーゼ活性を測定し、活性画分を回収した。

BIO-GEL HT (BIO-RAD社製) によるハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーで得られた活性画分280 mLを、ピバフロー50 (ザルトリウス (株) 製) 分画分子量10000の限外ろ過膜を用いて、20 mLに濃縮した。

この濃縮液を、予め0.3 mol/L塩化ナトリウム含有20 mmol/Lトリス-塩酸 (pH 8) 緩衝液で平衡化をしたSuperdex 200 p.gカラム (Pharmacia Biotech社製) (2.2 cmφ×66 cm) に供し、同緩衝液を1.5 mL/分の流速で流した。カラム流下後は10 mLずつ分取して、各フラクションのタンパク量とD-アミノアシラーゼ活性を測定した。

D-アミノアシラーゼ活性が確認された画分の少量をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 分析に供し、不純蛋白質が混在しないことを確認した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法は、PAGミニ「第一」10/20 (第一化学薬品 (株) 製) を用い、第一化学薬品 (株) のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動操作法に則って行った。SDS-サンプル処理液 (第一化学薬品 (株) 製) 50 μL と精製フラクション50 μL を同量混合し、5分間煮沸処理を行った。

PAGミニ「第一」10/20ゲルに、煮沸処理を行ったサンプルを20 μL 供し、40 mAの定電流で電気泳動を行い、ページブルー83染色液 (第一化学薬品 (株) 製) で染色後、目的のD-アミノアシラーゼと推定される蛋白質のバンドを確認した。

比活性 (蛋白質量に対する酵素活性の比率) 及び電気泳動で純度が高いことを確認した。この活性画分を集め、ピバフロー50 (ザルトリウス (株) 製) 分画分子量10000の限外ろ過膜、さらにピバポア10/20 (ザルトリウス (株) 製)

分画分子量 7 5 0 0 の限外ろ過膜を用いて濃縮操作を行い、精製酵素として 2 8 mL 得た。

本精製法による酵素精製収率は表 1 のとおりであった。

表 1

工程名	液 量 (mL)	総タンパク量 (mg)	総活性量 (KU)	比活性 (U/mg)	活性回収率 (%)
破碎遠心上清	114	4605	2707	588	100
SuperQ-650M	968	47	1334	28300	49
BIO-GEL HT	280	27	1125	41600	42
Superdex200	346	25	1003	40100	37
濃縮液	28	23	953	41400	35

実施例 4 精製酵素の酵素学的性質

実施例 3 で得られたデフルビバクター エスピー A 1 3 1-3 株由来の D-アミノアシラーゼ（以下、本酵素と記載することもある）の酵素学的性質を、以下の方法で測定した。

1. 分子量の測定は、前述の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（第一化学薬品（株）製、PAGミニ「第一」10/20）で測定を行った。タンパク質分子量マーカー（第一化学薬品（株）製、タンパク質分子量マーカー「第一」・III）フォスフォリラーゼ b（97, 400 ダルトン）、ウシ血清アルブミン（66, 267 ダルトン）、アルドラーゼ（42, 400 ダルトン）、カルボニックアンヒドラーゼ（30, 000 ダルトン）、トリプシンインヒビター（20, 100 ダルトン）、リゾチーム（14, 400 ダルトン）の移動度より求めた分子量は約 55, 000 ダルトンであった（図 1）。

2. ゲルろ過による分子量の測定は、Superdex 200 pgHR10/30（Pharmacia Biotech 社製）（1 cm φ × 30 cm）により、0.3 mol/L 塩化ナトリウム含有 20 mmol/L トリス-塩酸（pH 8）緩衝液で流速 1 mL/min、検出 280 nm で分析を行った。分子量マーカーには LMW GEL FILTRATION CALIBRATION KIT（PHARMACIA BIOTECH 社製）Bovine

Serum Albumin (67,000ダルトン)、Ovalbumin (43,000ダルトン)、Chymotrypsinogen A (25,000ダルトン)、Ribonuclease A (13,700ダルトン)を用い、分子量と溶出時間との関係を求めた。本酵素を同じ条件で分析し算出した分子量は約56,000ダルトンであった。

3. タンパク質等電点は、2次元電気泳動法に則り、変性系2次元電気泳動（第一化学薬品（株）製、IPGチューブゲル「第一」4-10及びPAGラージ「第一」2D-10/20）を用いて測定した。2D-タンパク質等電点マーカー（第一化学薬品（株）製、2D-タンパク質等電点マーカー「第一」）pI値5.1、5.2、5.3、5.4、5.7、6.0、6.2、6.4、6.5、6.7、6.8、7.0、7.1の移動度を基準として求めた本酵素のpI値は5.3であった。

4. 基質特異性は、前述したD-及びL-アミノ酸オキシダーゼ発色試薬を用いた活性測定法に則り検討した。すなわち、初めに200 $\mu\text{mol/L}$ 、150 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ の各D-アミノ酸及びL-アミノ酸を基質として用いて反応し、得られた555nmの吸光度値と基質濃度の関係から酵素活性の検量線を作成した。

次に同様の発色試薬を用い基質として、100mmol/LのN-アセチル-D, L-バリン、N-アセチル-D, L-メチオニン、N-アセチル-D, L-トリプトファン、N-アセチル-D, L-ロイシン、N-アセチル-D, L-フェニルアラニン、N-アセチル-D, L-チロシン、N-アセチル-D, L-グルタミン酸を用いて、以下の方法で各アセチルアミノ酸に対する反応を調べた。

すなわち、10mLの0.1mol/Lリン酸緩衝液pH8に4-Aminoantipyrine 0.61mg（ナカライテスク（株）製、Code:01907-52）、N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline, sodium, salt, dihydrate 3.22mg（Dojindo Laboratories製、Code:OC13）、PEROXIDASE 30 unit（SIGMA社製、

Code:P-6782)、D-AMINO ACID OXIDASE 1 unit (SIGMA社製、Code:A-9128) 又はL-AMINO ACID OXIDASE 1 unit (SIGMA社製、Code:A-5147)、を溶解して発色試薬とし、この発色試薬 500 μ L と 100 mmol/L の各アセチルアミノ酸基質溶液 100 μ L、一定濃度の本酵素液 100 μ L、0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH8) 300 μ L を含む 1 mL の反応液を 37℃ で 30 分間加温後、分光光度計を用い 555 nm の吸光度値を測定し、各D-アミノ酸及びL-アミノ酸を用いて作成した検量線から酵素活性量を求めた。

尚、1 U は 1 分間に 1 μ mol/L の各D-アミノ酸及びL-アミノ酸の生成を触媒する酵素量とし、上記で求めたD-アミノ酸及びL-アミノ酸の濃度との関係式から算出した。

基質特異性は、N-アセチル-D-メチオニンを 100 にした場合と、N-アセチル-D-バリンを 100 にした場合の相対活性で表 2 に示した。

表 2

基 質	相対活性(%対Met)	相対活性(%対Val)
N-Ac-D-Val	762	100
N-Ac-D-Met	100	13
N-Ac-D-Trp	1.1	0.2
N-Ac-D-Leu	555	73
N-Ac-D-Phe	37	4.8
N-Ac-D-Tyr	8.4	1.1
N-Ac-D-Glu	0	0
N-Ac-L-Val	0	0
N-Ac-L-Met	0	0
N-Ac-L-Trp	0	0
N-Ac-L-Leu	0	0
N-Ac-L-Phe	0	0
N-Ac-L-Tyr	0	0
N-Ac-L-Glu	0	0

N-アセチル-D-アミノ酸またはN-アセチル-L-アミノ酸を用いて反応を確認した結果、N-アセチル-D-アミノ酸のみに作用し、N-アセチル-L-アミノ酸にはまったく作用しなかった。N-アセチル-D-アミノ酸の中では

N-アセチル-D-バリンに最も良く作用し、N-アセチル-D-ロイシン、N-アセチル-D-メチオニン、N-アセチル-D-トリプトファン、N-アセチル-D-フェニルアラニン、N-アセチル-D-チロシンにも作用した。しかし、N-アセチル-D-グルタミン酸には作用しなかった。N-アセチル-L-アミノ酸として、N-アセチル-L-バリン、N-アセチル-L-ロイシン、N-アセチル-L-メチオニン、N-アセチル-L-トリプトファン、N-アセチル-L-フェニルアラニン、N-アセチル-L-チロシン及びN-アセチル-L-グルタミン酸のN-アセチル-L-アミノ酸には作用しなかった。

5. 温度安定性は、本酵素液をpH 8.5で4℃、25℃、30℃、40℃、50℃で1日加温し、前述のD-アミノ酸オキシダーゼを用いるD-アミノアシラーゼ活性測定法に則り加温処理後の残存活性を測定して確認した。本酵素の温度安定性を図2に示す。本酵素は、4℃から30℃まで残存活性が80%以上であり、安定であった。

6. 至適温度は、本酵素液をpH 8で4℃、25℃、30℃、37℃、40℃で前述のD-アミノ酸オキシダーゼを用いるD-アミノアシラーゼ活性測定法に則り活性測定を行って確認した。本酵素の至適温度を図3に示す。本酵素は、37℃において作用が至適であった。

7. pH安定性は、本酵素をpH 4から12で温度30℃1日加温後、前述のD-アミノ酸オキシダーゼを用いるD-アミノアシラーゼ活性測定法に則りpH処理後の残存活性を測定して確認した。本酵素のpH安定性を図4に示す。結果本酵素は、pH 9付近で最も安定であり、pH 7付近からpH 10付近でも残存活性が50%以上であり比較的安定であった。なお、pH 6あるいはpH 11でも残存活性は0%にはならなかった。

8. 至適pHは、本酵素を温度37℃でpH 6から12で前述のD-アミノ酸オキシダーゼを用いるD-アミノアシラーゼ活性測定法に則り酵素活性を測定して確認した。本酵素の至適pHを図5に示す。本酵素は、pH 8からpH 8.5付近で最も良

く作用した。

9. 金属イオンの影響は、0.5 mol/L N-アセチル-D-バリンと本酵素液(500 U)を含む反応液に、終濃度1 mmol/Lになるように、塩化カルシウム・2水和物、塩化鉄(III)・6水和物、塩化ナトリウム、塩化コバルト(II)・6水和物、塩化カリウム、塩化ニッケル・6水和物、塩化マグネシウム・6水和物、硫酸銅(II)・5水和物、塩化マンガン(II)・4水和物、塩化亜鉛、モリブデン酸ナトリウムを添加して、40℃で1日加温し、生成されたD-バリン量を以下に記述するHPLC法により測定し、検出されたN-アセチル-D-バリンとD-バリンの面積比から各金属を添加した場合の分割率を求め、金属イオン無添加における分割率を100として相対値を求めた。

その結果、表3に示すように本酵素は1 mmol/Lの Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} で相対活性が50%未満となり活性が阻害された。

HPLC測定法は、Inertsil ODS-2 (GLサイエンス(株)製) カラムを用い、0.015% 1-ペンタンスルホン酸ナトリウム(pH 2.5): アセトニトリル=80:20緩衝液を用い、流速0.5 mL/分、検出230 nm、カラム温度30℃でHPLC分析した。

表 3

金属イオン	1.0 mmol/L	相対活性(%)
無添加		100
塩化カルシウム		99
塩化鉄(III)		88
塩化ナトリウム		99
塩化コバルト(II)		27
塩化カリウム		92
塩化ニッケル		20
塩化マグネシウム		90
硫酸銅(II)		90
塩化マンガン(II)		48
塩化亜鉛		31
モリブデン酸ナトリウム		105

10. 阻害剤の影響は、0.5 mol/L N-アセチル-D-バリンと本酵素液 (500 U) を含む反応液に、終濃度 5 mmol/L になるようにエチレンジアミン四酢酸、2-メルカプトエタノール、N-エチルマレイミド、o-フェナントリン、L-システイン、ヨードアセトアミド、ジチオスレイトールを添加して 40℃で1日加温し、生成されたD-バリン量を前述したHPLC法により測定し、検出されたN-アセチル-D-バリンとD-バリンの面積比から各阻害剤を添加した場合の分割率を求め、阻害剤無添加における分割率を100として相対値を求めた。

その結果、表4に示すように本酵素は5.0 mmol/Lのジチオスレイトール、2-メルカプトエタノールで相対活性が50%未満、o-フェナントリンで相対活性が60%未満、L-システインで相対活性が80%未満となり、活性が阻害された。

表4

阻害剤 5 mmol/L	相対活性 (%)
エチレンジアミン四酢酸	112
2-メルカプトエタノール	47
N-エチルマレイミド	100
o-フェナントリン	53
L-システイン	78
ヨードアセトアミド	107
ジチオスレイトール	38

実施例5 新規D-アミノアシラーゼのクローニング

本菌株のデフルビバクター エスピー A131-3 (Defluviobacter sp. A131-3) より精製を行い、単離されたD-アミノアシラーゼを元に、公知の方法により、そのN末及び内部アミノ酸配列を分析し、N末;KSFDLVIRNGRVVDP、内部;AQAQGLXITXEA、TALIPAQIVERの配列を得た。このアミノ酸から考えられるDNA配列をすべて包含したN末及び内部配列ミックスプライマーATHMGIAAYGGI

MGIGTIGT（配列番号3）、及びCKYTCTACDATYTGIGCIGGDAT（配列番号4）の2種類の調製を行った。なお、Iは、イノシンを表している。

次に、デフルビバクター エスピー A131-3培養菌体より、公知の方法を用いゲノムDNAの抽出を行った。

精製酵素から得られたミックスプライマーと、培養菌体より得られたゲノムDNAを用いHot Star Taq(QIAGEN製)でPCR反応を行った。PCRには、供給業者から提供される緩衝液中に以下のものを含む反応液(10 μ l)を使用した：dNTP 200 μ M、各プライマー50pmol、デフルビバクター エスピー A131-3のゲノムDNA100ng、およびDNAポリメラーゼ1ユニット。反応は、95 $^{\circ}$ Cでの変性15分間の後1) 95 $^{\circ}$ Cでの変性段階30秒間；2) 40 $^{\circ}$ Cでのアニーリング段階30秒間；3) 72 $^{\circ}$ Cでの合成段階90秒間を、30サイクル行った。アガロース電気泳動で確認したところ約1.3kbのDNA増幅があった。得られたPCR産物をpCR2.1topo（インビトロジェン社製）を用いてクローニングを行い、部分塩基配列(部分遺伝子)の決定を行った。

得られた部分遺伝子を元に、プライマーATACCGCTACATCGGCAATCGCAT（配列番号5）、及びTGCCACTGGTTGAAGCCATCGCCA（配列番号6）の2種類を設計合成しInverse PCR法を用いてHot Star Taq(QIAGEN製)でPCR反応を行った。Inverse PCR法に用いる鋳型は、デフルビバクター エスピー A131-3から抽出した5 μ gのゲノムを制限酵素Sal I (NEB)を用い37 $^{\circ}$ Cにて一晩消化・精製したものを、T4 Ligase(NEB)で環状化したものを用いた。反応は、95 $^{\circ}$ Cでの変性15分間の後1) 94 $^{\circ}$ Cでの変性段階30秒間；2) 60 $^{\circ}$ Cでのアニーリング段階30秒間；3) 72 $^{\circ}$ Cでの合成段階4分間を、30サイクル行った。得られたPCR産物をpCR2.1topoを用いてクローニングを行い、全塩基配列(全遺伝子)の決定を行った。

この塩基配列の結果から、N末の外側及びC末のプライマーATGGCCAAAAGCTTCGATCTC(配列番号7)、及びTCATCGCGCGTGCTCCGGATG（配列番号8）の作製を行

い、Hot Star Taq(QIAGEN製)及びKOD plus(TOYUBO製)のポリメラーゼを用いてPCR反応を行った。Hot Star Taqの反応は、95℃での変性15分間の後1) 94℃での変性段階30秒間; 2) 58℃でのアニーリング段階30秒間; 3) 72℃での合成段階2分間を、30サイクル行い、KOD plusの反応は、95℃での変性2分間の後1) 94℃での変性段階30秒間; 2) 58℃でのアニーリング段階30秒間; 3) 68℃での合成段階2分間を30サイクル行った。得られたPCR産物をpCR2.1topoを用いてクローニングを行い、クローンの塩基配列を比較し、本発明D-アミノアシラーゼ遺伝子の塩基配列(配列番号1)並びに本発明D-アミノアシラーゼのアミノ酸配列(配列番号2)を確定した。

実施例6 D-バリンの製造

15%N-アセチル-D, L-バリン水溶液を基質として用い、デフルビバクター エスピー A131-3株由来のD-アミノアシラーゼが基質水溶液1mL当たり200Uの酵素量を添加し、40℃で3日間反応を行い、生成されたN-アセチル-D, L-バリンからD-バリンの分割生成率を、実施例1(2)記載のHPLC測定法で測定した。結果を図6に示す。

本酵素を基質水溶液に200U/mL含有する系で、反応1日目でN-アセチル-D, L-バリン中のN-アセチル-D-バリンの90%以上がD-バリンに変換されており、その分割率は90%以上であった。

また、N-アセチル-L-バリンは全く分解されず、本酵素がD-アミノ酸の製造に関して実用性を有することが確認された。

請求の範囲

1. 次の酵素学的性質を有するD-アミノアシラーゼ。
 - (a) 作用：N-アセチル-D-アミノ酸に作用しD-アミノ酸を生成する。
 - (b) 分子量：SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における測定で、分子量約55,000ダルトンを示す。
 - (c) 等電点：変性系2次元電気泳動における測定で、等電点5.3を示す。
 - (d) 基質特異性：N-アセチル-D-アミノ酸に作用し、特にN-アセチル-D-バリンに良く作用し、N-アセチル-L-アミノ酸に作用しない。基質として、N-アセチル-D-バリン、N-アセチル-D-ロイシン、N-アセチル-D-メチオニン、N-アセチル-D-トリプトファン、N-アセチル-D-フェニルアラニン、N-アセチル-D-チロシンに作用し、N-アセチル-L-バリン、N-アセチル-L-ロイシン、N-アセチル-L-メチオニン、N-アセチル-L-トリプトファン、N-アセチル-L-フェニルアラニン、N-アセチル-L-チロシンには作用しない。
 - (e) 温度安定性：pH8.5で1日加温した場合、4℃から30℃まで比較的安定である。
 - (f) 至適温度：pH8で30分反応させた場合、37℃において作用が至適である。
 - (g) pH安定性：温度30℃で1日加温した場合、pH9付近で安定であり、pH7付近からpH10付近でも比較的安定である。
 - (h) 至適pH：温度37℃で反応させた場合、pH8からpH8.5付近で最も良く作用する。
 - (i) 金属イオンの影響：1mmol/Lの Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} で活性が阻害される。
 - (j) 阻害剤の影響：5mmol/Lのジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール

ール、*o*-フェナントリン、*L*-システインで活性が阻害される。

2. 次の(a)又は(b)のいずれかに記載のタンパク質からなるD-アミノアシラーゼ。

(a) 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入したアミノ酸配列からなり、D-アミノアシラーゼ活性を有するタンパク質。

3. 次の(a)又は(b)のいずれかに記載のタンパク質からなるD-アミノアシラーゼをコードする遺伝子。

(a) 配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入したアミノ酸配列からなり、D-アミノアシラーゼ活性を有するタンパク質。

4. 次の(c)又は(d)のDNAからなるものである請求項3記載の遺伝子。

(c) 配列番号1に記載の塩基配列からなるDNA。

(d) 配列番号1に記載の塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつD-アミノアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

5. N-アセチル-D, *L*-アミノ酸又はN-アセチル-D-アミノ酸からD-アミノ酸を生成するD-アミノアシラーゼを産生するデフルビバクター(*Defluviobacter*)属に属する微生物。

6. デフルビバクター・エスピー(*Defluviobacter* sp.) A131-3と命名され、FERM BP-08563として寄託された請求項5記載の微生物。

7. 請求項1又は2記載のD-アミノアシラーゼを産生するものである請求項5又は6記載の微生物。

8. 請求項5～7のいずれか1項記載の微生物を培養し、その培養物からD-アミノアシラーゼを採取することを特徴とする請求項1又は2記載のD-アミノアシラーゼの製造方法。

9. 請求項1又は2記載のD-アミノアシラーゼをN-アセチル-D, L-アミノ酸又はN-アセチル-D-アミノ酸に作用させることを特徴とするD-アミノ酸の製造方法。

図 1

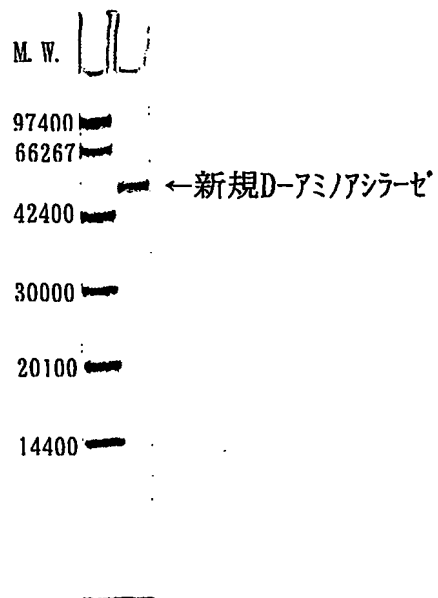


図 2

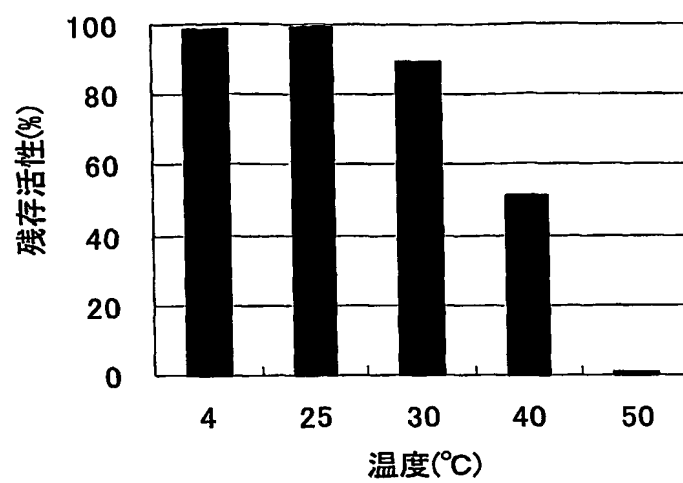


图 3

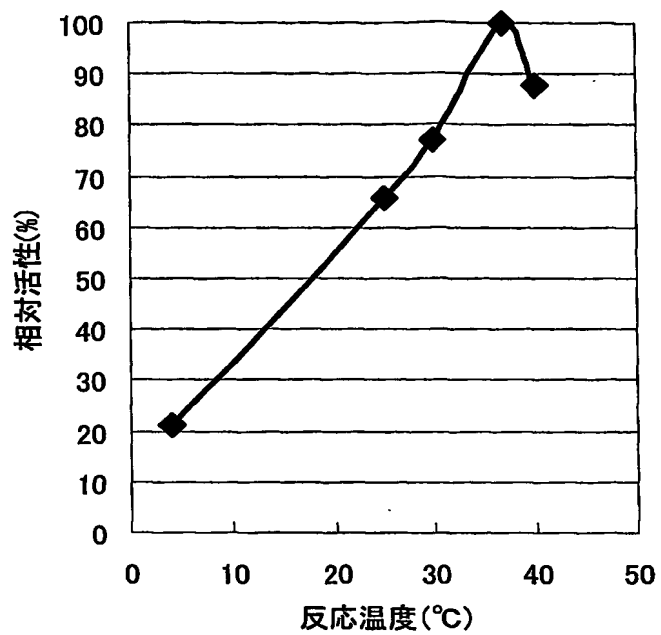


图 4

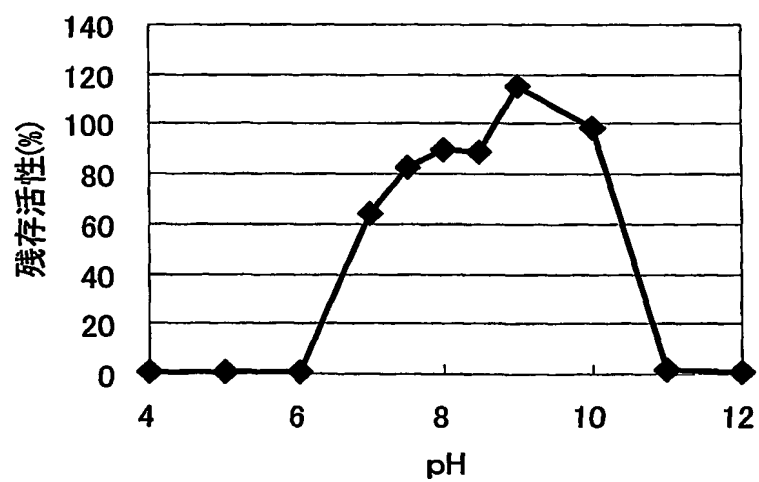


図 5

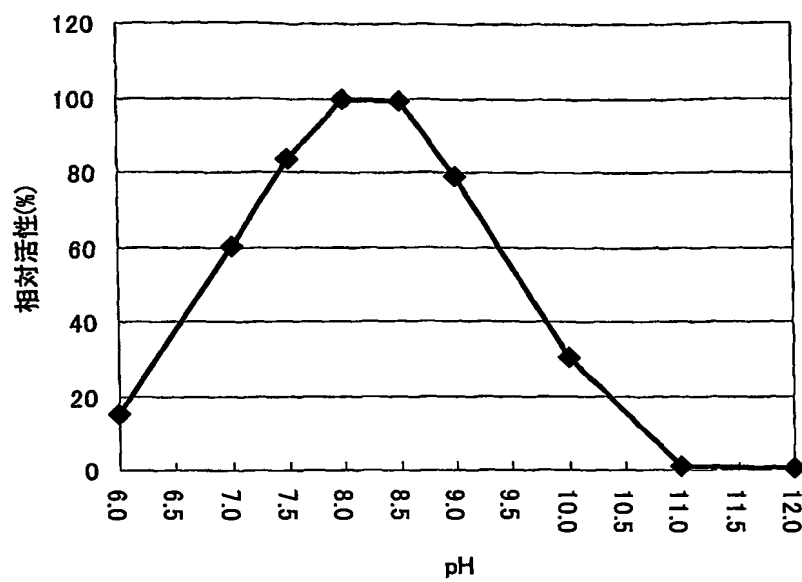
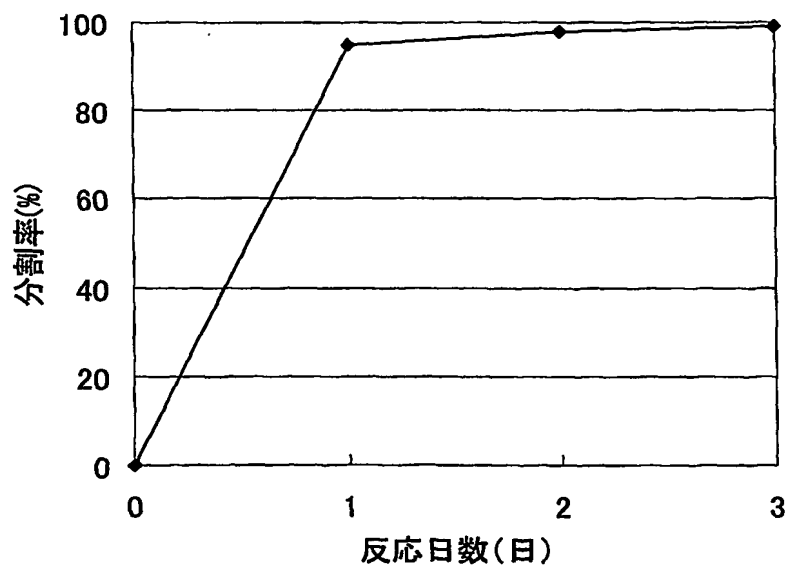


図 6



SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.
Isobe, Kimiyasu

<120> D-aminoacylase

<130> DC0050

<150> JP 2002-366389

<151> 2002-12-18

<150> JP2003-351560

<151> 2003-10-10

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1500

<212> DNA

<213> Defluviobacter sp. A131-3

<400> 1
atggccaaaa gcitcgatct cgtcattcgc aacggcaggg tcgtcgatcc ggaaaccggt 60
catgatgcga ttgccgatgt agcggatcc ggccggccaga tcgttcgagt cggtcgctcg 120
ctaggtgccg gaaagaggga gatcgacgcg accgggctcg ttgtctcacc gggcttcatt 180
gacctccatg cccacgggca atccattccc gccgaccgga tgcaggccit cgacggcgtc 240
accaccgcgc tggagcttga ggtgggctcg ctgcccgctc gcgcctggta cgaacagcag 300
caggccgggg gccgcgtgct caactacggg accgccgctg catggatctt cgcgcgcaag 360
gccgtgatga tcggaatgga actcgatggc cgcctcgcgc cgatcgagat gatgggtgcc 420
ggctccgacg acatgcgctg gtcgggtggac gccgcgactg cggcgcagac cgaatgatatt 480
gtccggctga cgcgtcaggc tctcgaagaa ggcgcactcg gcatcggcat acctcacggc 540
tatgccgccg gcgctggcgt caaggaaatg acgcgaatct gcgaactggc tgcagaattc 600
gaccggccga cctataccca cattccctac atgtccaaca ttgaccccag aagctcggtc 660
gaggcttaig tgcaactgat cggcctggcc ggtgcaaccg gcgcacacat gcatacttgc 720
caccttaaca gcaccagcct gcgggacgtc gaggatgccg cgaggctgat cgccaaagca 780
caggcacagg gtcttccgat caccaccgag gcctatccct acggcacggg atcgaccgtg 840
atgagcgccc gcttcttcal tgactccgat ttlgccgaac gaaccggaac gggctacgac 900
gccatccagg tcgtctcgag cggcaagcgc ttlgagaacc gggacgaact cgtggcagcg 960

cgcgccgaaa ccccggaagc actgggtgctg tggcattatc tcgacaccga caatccccac 1020
 gatcagcggc tgctcgacgt ctccgtgatg tatccgggcg gcgccatcgc ctccgatgcg 1080
 gtgccgtgga gcaatcccga cgggacgctg tacaccggcg aggaatggcc gctcccggcc 1140
 gacaagacgt cccatccgcg ctccggccggc acctatacc gcttcctcgc ccagtggggtg 1200
 cgcgaacgcg aggcggtgcc actgggtgaa gccatcgcca aatgcgcgct cattccagcg 1260
 cagatcgctg agcgcgtgcag cgacgtgttc cgccgcaagg gccggcttca gcccggatgc 1320
 gacgccgaca tcgtgatttt cgacctgaa tccgtgcagg acaggtaaac gttcgaggac 1380
 atgcacctcg ccgccgacgg catggiccat gtgctgggtc acggcgaggc cgtgatcgcg 1440
 aatggcgaac tcgtgcgcga cgcgcgttcc ggccgtgcca tccggagcac gccgcgatga 1500

<210> 2
 <211> 499
 <212> PRT
 <213> Defluviobacter sp.A131-3

<400> 2

Met Ala Lys Ser Phe Asp Leu Val Ile Arg Asn Gly Arg Val Val Asp
 1 5 10 15

Pro Glu Thr Gly His Asp Ala Ile Ala Asp Val Ala Val Ser Gly Gly
 20 25 30

Gln Ile Val Ala Val Gly Pro Ser Leu Gly Ala Gly Lys Arg Glu Ile
 35 40 45

Asp Ala Thr Gly Leu Val Val Ser Pro Gly Phe Ile Asp Leu His Ala
 50 55 60

His Gly Gln Ser Ile Pro Ala Asp Arg Met Gln Ala Phe Asp Gly Val
 65 70 75 80

Thr Thr Ala Leu Glu Leu Glu Val Gly Ser Leu Pro Val Ala Arg Trp
 85 90 95

Tyr Glu Gln Gln Gln Ala Gly Gly Arg Val Leu Asn Tyr Gly Thr Ala
 100 105 110

Ala Ala Trp Ile Phe Ala Arg Lys Ala Val Met Ile Gly Met Glu Leu
 115 120 125

Asp Gly Arg Leu Ala Pro Ile Glu Met Met Gly Ala Gly Ser Asp Asp
 130 135 140

Met Arg Trp Ser Val Asp Ala Ala Thr Ala Pro Gln Thr Asp Asp Ile
 145 150 155 160

Val Arg Leu Thr Arg Gln Ala Leu Glu Glu Gly Ala Leu Gly Ile Gly
 165 170 175

Ile Pro His Gly Tyr Ala Ala Gly Ala Gly Val Lys Glu Met Thr Arg
 180 185 190

Ile Cys Glu Leu Ala Ala Glu Phe Asp Arg Pro Thr Tyr Thr His Ile
 195 200 205

Pro Tyr Met Ser Asn Ile Asp Pro Arg Ser Ser Val Glu Ala Tyr Val
 210 215 220

Gln Leu Ile Gly Leu Ala Gly Ala Thr Gly Ala His Met His Ile Cys
 225 230 235 240

His Leu Asn Ser Thr Ser Leu Arg Asp Val Glu Asp Ala Ala Arg Leu
 245 250 255

Ile Ala Lys Ala Gln Ala Gln Gly Leu Pro Ile Thr Thr Glu Ala Tyr
 260 265 270

Pro Tyr Gly Thr Gly Ser Thr Val Met Ser Ala Arg Phe Phe Ile Asp
 275 280 285

Ser Asp Phe Ala Glu Arg Thr Gly Thr Gly Tyr Asp Ala Ile Gln Val
 290 295 300

Val Ser Ser Gly Lys Arg Phe Glu Asn Arg Asp Glu Leu Val Ala Ala
 305 310 315 320

Arg Ala Glu Thr Pro Glu Ala Leu Val Leu Trp His Tyr Leu Asp Thr
 325 330 335

Asp Asn Pro His Asp Gln Arg Leu Leu Asp Val Ser Val Met Tyr Pro
 340 345 350

Gly Gly Ala Ile Ala Ser Asp Ala Val Pro Trp Ser Asn Pro Asp Gly
 355 360 365

Thr Leu Tyr Thr Gly Glu Glu Trp Pro Leu Pro Ala Asp Lys Thr Ser
 370 375 380

His Pro Arg Ser Ala Gly Thr Tyr Thr Arg Phe Leu Ala Gln Trp Val
 385 390 395 400

Arg Glu Arg Glu Ala Val Pro Leu Val Glu Ala Ile Ala Lys Cys Ala
 405 410 415

Leu Ile Pro Ala Gln Ile Val Glu Arg Cys Ser Asp Val Phe Arg Arg
 420 425 430

Lys Gly Arg Leu Gln Pro Gly Cys Asp Ala Asp Ile Val Ile Phe Asp
 435 440 445

Leu Glu Ser Val Gln Asp Arg Ser Thr Phe Glu Asp Met His Leu Ala
 450 455 460

Ala Asp Gly Met Val His Val Leu Val Asn Gly Glu Ala Val Ile Ala
 465 470 475 480

Asn Gly Glu Leu Val Arg Asp Ala Arg Ser Gly Arg Ala Ile Arg Ser
 485 490 495

Thr Pro Arg

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> Designed primer based on Defulvibacter sp.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n stands for i

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> n stands for i

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n stands for i

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n stands for i

<400> 3
athmgnaayg gnmngngtngt

20

<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> Designed primer based on Defluviobacter sp.

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> n stands for i

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n stands for i

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n stands for i

<400> 4
ckytcnacda tytngngcngg dat

23

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>

<223> Designed primer based on Defluviobacter sp.

<400> 5

ataccgctac atcggcaatc gcat

24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Designed primer based on Defluviobacter sp.

<400> 6

tgccactggt tgaagccatc gcca

24

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Designed primer based on Defluviobacter sp.

<400> 7

atggccaaaa gcttcgatct c

21

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Designed primer based on Defluviobacter sp.

<400> 8

tcatcgcggc gtgctccgga tg

22

1/1

PCT

DC0050

原本（出願用） - 印刷日時 2003年12月17日（17.12.2003）水曜日 10時14分16秒

0-1	様式-PCT/RO/134 (EASY) この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.07.2003)
0-2	国際出願番号.	
0-3	出願人又は代理人の書類記号	DC0050
1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。 記載頁 行	8 10
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
1-3-2	寄託機関のあて名	〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地 1 中央第6
1-3-3	寄託の日付	2002年09月26日 (26.09.2002)
1-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-08563
1-4	追加の表示	ヨーロッパ特許庁については、寄託微生物試料はEPC規則28(4)に従って、ヨーロッパ特許が発行される迄、請求人が指定した専門家に対してのみ入手可能とされることを要請する。
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
1-6	追加事項の表示の届け出 右記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。	なし (NONE)

受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	17.12.03
0-4-1	権限のある職員	半田捷子

国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	15 January 2004
0-5-1	権限のある職員	間 雄一郎

書式8(第7条第1項関係)

「特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブタペスト条約」

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される。

BUDAPEST TREATY OF THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE
RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL
DEPOSIT AUTHORITY identified at the bottom of this page.

原寄託についての受託証

氏名(名称)

第一化学薬品株式会社
取締役社長 蒔田 伸一郎 殿

あて名 〒103-0027
東京都中央区日本橋三丁目13番5号

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) Deftuvibacter sp. A131-3	(受託番号) FERM BP- 08563
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文章が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 14 年 9 月 26 日(原寄託日)に受領した1 欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、平成 14 年 9 月 26 日(原寄託日)に受領した1 欄の微生物を受託した。 そして、平成 15 年 12 月 9 日に原寄託によりブタペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。 (平成 14 年 9 月 26 日に寄託されたFERM P- 19045 号より移管)	
5. 国際寄託当局	
<p>名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター</p> <p>International Patent Organism Depositary National Institute of Advanced Industrial Science and Technology</p> <p>センター長 岡 修 Dr. Syuichi Oka, Director</p> <p>あて名 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566) AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan</p>	

平成 15 年 (03) 12 月 9 日

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC/P03/16182

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N9/80, C12N1/20, C12P41/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N9/80, C12N1/20, C12P41/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
JSTPlus (JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FRITSCH, K. et al., <i>Defluviobacter lusatiae</i> gen. nov., sp. nov., a new chlorohenol-degrading member of the alpha-2 subgroup of proteobacteria., Syst.Appl.Microbiol. (1999), Vol.22, No.2, pages 197 to 204	1-9
A	Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB, Int.J.Sys.Bacteriol. (1999), Vol.49, No.4, pages 1325 to 1326	1-9
A	LECHNER, U. et al., Degradation of 4-chloro-2-methylphenol by an activated sludge isolate and its taxonomic description., Biodegradation., (1995), Vol.6, No.2, pages 83 to 92	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search
30 January, 2004 (30.01.04)

Date of mailing of the international search report
10 February, 2004 (10.02.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/16182

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WAKAYAMA, M. et al., Primary structure of N-acyl-D-glutamate amidohydrolase from <i>Alcaligenes xylosoxydans</i> subsp. <i>xylosoxydans</i> A-6., J.Biochem. (Tokyo)., (1995), Vol.118, No.1, pages 204 to 209	1-9
A	MORIGUCHI, M. et al., Production, purification, and characterization of D-aminoacylase from <i>Alcaligenes xylosoxydans</i> subsp. <i>xylosoxydans</i> A-6., Biosci.Biotechnol.Biochem. (1993), Vol.57, No.7, pages 1149 to 1152	1-9
A	TSAI, YC. et al., Production and immobilization of D-aminoacylase of <i>Alcaligenes faecalis</i> DA1 for optical resolution of N-acyl-DL-amino acids., Enzyme Microb.Technol. (1992), Vol.14, No.5, pages 384 to 389	1-9
A	WO 02/61077 A1 (MITSUI CHEM. INC.); 08 August, 2002 (08.08.02), Full text & US 2003/0207436 A1 & KR 2002087948 A & JP 2002-320491 A	1-9
A	EP 976828 A1 (DAICEL CHEM.IND.LTD.), 02 February, 2000 (02.02.00), Full text & JP 2000-041684 A & US 2003/0113893 A1	1-9
A	EP 950706 A2 (DAICEL CHEM.IND.LTD.), 20 October, 1999 (20.10.99), Full text & US 6030823 A & JP 11-318442 A & DE 69905636 E	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N 9/80, C12N 1/20, C12P 41/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N 9/80, C12N 1/20, C12P 41/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	FRITSCH, K., et al., Defluviobacter lusatiae gen. nov., sp. nov., a new chlorohenol-degrading member of the alpha-2 subgroup of proteobacteria. Syst Appl Microbiol. (1999) Vol. 22, No. 2, p. 197-204	1-9
A	Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB, Int J Sys Bacteriol. (1999) Vol. 49, No. 4, p. 1325-1326	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 01. 2004

国際調査報告の発送日

10. 2. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子

4N

3038

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	LECHNER, U., et al., Degradation of 4-chloro-2-methylphenol by an activated sludge isolate and its taxonomic description. Biodegradation. (1995)Vol. 6, No. 2, p. 83-92	1-9
A	WAKAYAMA, M., et al., Primary structure of N-acyl-D-glutamate amidohydrolase from <i>Alcaligenes xylosoxydans</i> subsp. <i>xylosoxydans</i> A-6. J Biochem (Tokyo). (1995)Vol. 118, No. 1, p. 204-209	1-9
A	MORIGUCHI, M., et al., Production, purification, and characterization of D-aminoacylase from <i>Alcaligenes xylosoxydans</i> subsp. <i>xylosoxydans</i> A-6. Biosci Biotechnol Biochem. (1993)Vol. 57, No. 7, p. 1149-1152	1-9
A	TSAL, YC., et al., Production and immobilization of D-aminoacylase of <i>Alcaligenes faecalis</i> DA1 for optical resolution of N-acyl-DL-amino acids. Enzyme Microb Technol. (1992)Vol. 14, No. 5, p. 384-389	1-9
A	WO 02/61077 A1(MITSUI CHEM INC)2002. 08. 08, 全文 & US 2003/0207436 A1 & KR 2002087948 A & JP 2002-320491 A	1-9
A	EP 976828 A1(DAICEL CHEM IND LTD)2000. 02. 02, 全文 & JP 2000-041684 A & US 2003/0113893 A1	1-9
A	EP 950706 A2(DAICEL CHEM IND LTD)1999. 10. 20, 全文 & US 6030823 A & JP 11-318442 A & DE 69905636 E	1-9